

4. Material und Methoden

4.1 Patienten:

Wir untersuchten Leukozyten von Frühgeborenen, Reifgeborenen und von Erwachsenen. Die Einschlusskriterien für die Frühgeborenen waren

1. Gestationsalter 24 – 32 Schwangerschaftswochen
2. keine angeborenen Fehlbildungen und
3. keine peripartale Asphyxie (kein Nabelschnur-pH < 7,10)

Kriterien einer gesicherten Sepsis waren innerhalb der ersten drei Lebenstage eines oder mehrere der folgenden Kriterien: positive Blutkultur, CRP > 15 mg/l, Leukozytenzahl > 30.000/ μ l und Thrombozytenzahl < 100.000/ μ l.

Einschlusskriterien für Reifgeborene waren:

1. Gestationsalter > 38 Schwangerschaftswochen
2. keine angeborenen Fehlbildungen
3. unkomplizierter postnataler Verlauf.

Erwachsene: freiwillige, gesunde Probanden.

Blutentnahme: Das Nabelschnurblut von Früh- und Reifgeborenen wurde gleich nach Geburt aus einer Nabelarterie abgenommen, unter Bedingungen von maximal praktikabler Sterilität.

Die Antikoagulation erfolgte mit 10U/ml Heparin, anschließend wurde das Blut direkt verarbeitet.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin genehmigt.

4.2 Analytische Methoden:

4.2.1 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie (FACS=Fluorescence Antibody Cell Sorter) kann:

1. der Zelltyp (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) bestimmt werden.
2. die Expression bestimmter Moleküle auf der Zelloberfläche gemessen werden.

1. Bestimmung des Zelltyps:

Bei der FACS-Analyse passieren die Zellen in einer Spülflüssigkeit einzeln einen Argon-Ionen-Laser, der Licht einer genau definierten Wellenlänge emittiert. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, entstehen Streulichtsignale. Das sogenannte "Vorwärtsstreulicht" (engl.: forward scatter, FSC) erlaubt eine Aussage über die Größe der Zelle, wohingegen das im rechten Winkel zur Laser-Lichtquelle gemessene "Seitwärtsstreulicht" (engl.: side scatter, SSC) ein Maß für deren Granularität ist. Durch das Auftragen beider Größen in einem Diagramm (FSC über SSC) können einzelne Leukozytenpopulationen unterschieden werden ⁴⁷.

2. Messung der Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche:

Die zu messende Oberflächenstruktur, z.B. in unserer Untersuchung die Rezeptoren CD14 und CD11b, werden mit einem monoklonalen Antikörper markiert: CD14 mit dem Antikörper Anti-LeuM3 und CD11b mit dem Antikörper Anti- Leu15. Diese Antikörper sind jeweils mit dem fluoreszierenden Molekül Phycoerythrin konjugiert. Wird Phycoerythrin mit Strahlung einer bestimmten Wellenlänge durch einen Argon-Laser angeregt, emittiert es durch das Zurückspringen einzelner Elektronen in energieärmere Niveaus Licht einer charakteristischen Wellenlänge. Dieses emittierte Licht (Fluoreszenz) korreliert mit der Rezeptordichte der gemessenen Zelle.

Jede Zelle besitzt eine gewisse Grundfluoreszenz, die in ihrer Stärke allerdings erheblich unter der eben besprochenen Fluoreszenz liegt. Aus diesem Grund werden von den gemessenen Signalen Größe und Granularität linear aufgezeichnet, wohingegen die Fluoreszenz (FIU) logarithmisch aufgezeichnet wird. Anders als beispielsweise in der Immunfluoreszenzmikroskopie handelt es sich bei der

Durchflusszytometrie nicht um die Bildaufnahme eines ruhenden Objektes, sondern um eine dynamische Bestandsaufnahme, deren gespeicherte Daten zu einem beliebigen Zeitpunkt mit dem entsprechenden Softwareprogramm ausgewertet werden können.

4.2.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse:

Mit Hilfe einer entsprechenden Anwender-Software (XL software, Version 1996, Coulter) kann eine differenzierte Auswertung separater Zellpopulationen erfolgen. Hierfür definiert der Anwender in der FSC/SSC-Darstellung der gemessenen Probe sogenannte Gates. Das sind vom Benutzer definierte Felder, die ausnahmslos eine bestimmte Zellpopulation, z.B. Granulozyten umschließen. Nachdem ein solches Gate definiert ist, wertet der Rechner nur die innerhalb dieses "gates" liegenden Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz aus. Somit kann die Expression eines bestimmten Oberflächenmoleküls (hier CD14 und CD11b) in einer definierten Zellpopulation bestimmt werden.

Ebenso wie sich Zellen nach ihrer Morphologie eingrenzen und in ihrer Fluoreszenzintensität darstellen lassen, kann man sie nach ihrer Fluoreszenzintensität eingrenzen und anschließend in ihrer Morphologie darstellen. Dieses "Rückgating", in dem ausschließlich die Zellen mit hoher Fluoreszenz in ihrer Morphologie dargestellt werden, habe ich mir bei der Auswertung der Monozyten Frühgeborener zunutze gemacht.

Diese Form der Identifikation hat sich bei Frühgeborenen als zuverlässiger und genauer erwiesen, da deren Leukozyten sich im FSC/SSC-Histogramm nicht eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Ein Grund hierfür ist die z. T. sehr hohe Zahl an kernhaltigen Normoblasten (bis zu 68 Normoblasten pro 100 Leukozyten), die sich nicht lysieren lassen und das vom FACS erstellte Zellbild stören. Ein weiterer Grund könnte eine unvollständige Ausreifung der Monozyten sein, die in ihrer Morphologie noch sehr heterogen sind.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung werden vom Rechner auf eine unbekannte Bezugsgröße normiert dargestellt. Die Resultate liefern somit keine absoluten

Werte, die einen direkten Vergleich mit anderen Fluoreszenzmeßmethoden erlauben.

Eine Kalibrierung des FACS wurde vor jeder Messung durchgeführt, mit einer dem Gerät entsprechenden Kalibrierungsflüssigkeit. Damit wurde gewährleistet, dass die gemessenen Werte der Fluoreszenz, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden, untereinander vergleichbar waren.

Für die Untersuchung wurde ein FACS-Gerät von Coulter, Profile 2 verwendet.

Für jede Analyse wurden 40.000 Zellen gemessen. Gebundenes CD14 und CD11b wurde definiert als Fluoreszenzintensität (FIU) bzw. Leu15-PE und LeuM3-PE abzüglich der Isotypen-FIU (IgG2-PE; Coulter, Miami, Florida, USA, bzw. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). So wird der unspezifischen Bindung Rechnung getragen und von der Analyse ausgeschlossen.

4.2.3 Messung der CD14 -Expression auf PNG/Monozyten mittels FACS

- 1) Markierung der Zellen mit dem CD14-Antikörper (MY4 von Coulter; Miami, Florida, USA) mit 10 µl der Antikörperlösung pro Probe
- 2) Inkubation über 30 Minuten im Dunkeln auf Eis
- 3) Erythrozytenlyse mit je 2 ml FACS-Lyselösung (Becton Dickinson; Heidelberg, Deutschland) pro Röhrchen, gründliches Schütteln, anschließende Inkubation über 10 Minuten im Dunkeln auf Eis.
- 4) Zentrifugieren mit 2000 rpm bei 4°C über 5 Minuten, Überstand verwerfen und Pellets mit 4°C kaltem PBS insgesamt 3 mal waschen.
- 5) Fixierung der Zellen mit 2 %-iger Formaldehydlösung
- 6) Messung der Proben im FACS innerhalb von 24 Stunden

4.2.4 Messung der CD11b –Expression auf PNG mittels FACS

- 1) Markierung der Zellen mit dem CD11b-Antikörper (Leu 15- Phycoerythrin; Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland) mit 10 µl der Antikörperlösung pro Probe
- 2) Inkubation über 30 Minuten im Dunkeln auf Eis
- 3) Erythrozytenlyse mit je 2 ml FACS-Lyselösung pro Röhrchen, gründliches Schütteln, anschließende Inkubation über 10 Minuten im Dunkeln auf Eis.

- 4) Zentrifugieren mit 2000 rpm bei 4°C über 5 Minuten, Überstand verwerfen und Pellets mit 4°C kaltem PBS insgesamt 3 mal waschen.
- 5) Fixierung der Zellen mit 2 %-iger Formaldehydlösung
- 6) Messung der Proben im FACS innerhalb von 24 Stunden

4.2.5 Messung der IL-8 Konzentration und der PML-Elastase im Serum mit Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Materialien:

Verwendet wurden die kommerziell erhältlichen Testkits für IL-8 (PeliKine Compact™ der Central Laboratory of the Netherlands Red Cross; Amsterdam, Niederlande), und für PML-Elastase (Milenia von DPC-Biermann; Bad Nauheim, Deutschland).

Durchführung:

Die bei -80 °C gelagerten Serumproben wurden vor Durchführung des ELISA auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Mikrotiterplatten für IL-8 mussten zuvor mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-8 beschichtet werden. Die Mikrotiterplatten für PML-Elastase waren bereits mit dem ersten Antikörper beschichtet. Das im Serum vorhandene IL-8 bindet an diese Antikörper der festen Phase. Nachdem überschüssige Bestandteile der Proben und des Standards durch Waschen entfernt wurden, wurde dem Komplex ein Meerrettich-Peroxidase konjugierter monoklonaler Antikörper hinzugegeben. Nach entsprechender Inkubation bildet sich ein Sandwich-Komplex aus erstem Antikörper, IL-8 und konjugiertem Antikörper. Nach einem weiteren Waschschrift, bei dem überschüssiges Konjugat entfernt wird, kommt es durch Zugabe von Chromogens Tetramethylbenzidin zu einer Farbentwicklung, die nach einer halbstündigen Inkubation mit dem Stopreagenz aus 1,8 molarer Schwefelsäure beendet wurde.

Die Absorption des farbigen Endprodukts wurde innerhalb von 30 Minuten in einem Photometer (Microtiter-Reader SLT Spectra, SLT Labinstruments Deutschland

GmbH) bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Die untere Nachweisgrenze betrug für IL-8 0,02 ng/ml, für PML-Elastase 30 ng/ml. Anhand der Standardkurve wurde der Variationskoeffizient und die Konzentrationen in den Proben ermittelt.

4.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SPSS 6.1.3 (SPSS-Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Die Daten sind als Mittelwert der Standardabweichung angegeben.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem t- Test für unabhängige Proben bestimmt.

Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4.3 Protokolle:

4.3.1 Experiment 1

Messung der CD14 und CD11b-Expression auf Leukozyten nach LPS-Stimulation (Escherichia coli, Serotyp 0111:B4; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

1) Aufteilung der Proben

bei adultem Vollblut in jeweils 100 µl Proben, bei neugeborenem Vollblut jeweils 50 µl Nabelschnurblut und 50 µl 0,9%-iges NaCl aufgrund der etwa doppelt so hohen Zellzahl bei Neugeborenen. Diese Verdünnung wurde bei der Analyse der löslichen Faktoren berücksichtigt

2) Vorbereitung der Verdünnungsreihe:

40 µg LPS in 1 ml PBS, 4 x-ige 1:10 Verdünnung

3) Stimulation der Vollblutproben durch jeweils 5 µl der entsprechenden

Verdünnungslösung, zusätzlich in eine Probe 5 µl NaCl als Nativkontrolle.

Das entspricht:

a) nativ

b) 0,2 ng/ml LPS

- c) 2 ng/ml LPS
- d) 20 ng/ml LPS
- e) 200 ng/ml LPS
- f) 2000 ng/ml LPS

(Da LPS die Neigung hat, an Polyethylenoberflächen zu binden, wurde die Verdünnungsreihe jedes Mal neu angesetzt, um Konzentrationsschwankungen zu vermeiden.)

- 4) Inkubation über eine Stunde bei 37 °C auf niedrigster Stufe eines Eppendorf Thermomixer 5436 geschüttelt
 - 5) Vorbereitung der Resuspensionslösung:
1:10 Verdünnung von 0,5 g BSA in 10 ml PBS
 - 6) Abseren der Proben mit 2000 rpm über 5 Minuten in einer Biofuge fresco/Heraeus Instruments und anschließendes Einfrieren des Serums bei -80°C
 - 7) Resuspension mit kalter Lösung
 - 8) Erneute Zentrifugation über 5 Minuten mit 2000 rpm
- Anschließend Messung von CD14/CD11b wie unter 4.2.3 und 4.2.4 beschrieben.

4.3.2 Experiment 2:

Blockierung von CD14 und anschließende Messung der CD11b- Expression nach LPS-Stimulation

1. Blutentnahme und Antikoagulation
2. Aufteilung des Blutes in 2 x 6 100µl Proben
3. Abseren der ersten 6 Proben
4. Blockierung dieser Proben mit jeweils 10 µl der anti-CD14 MY4 Antikörperlösung
5. Inkubation über 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
6. Abseren der Proben und Resuspension mit 0,9 %-igem NaCl
7. Vorbereitung der LPS- Verdünnungsreihe
8. Stimulation der Proben wie folgt:
 - 2 x nativ
 - 2 x 0,2 ng/ml LPS

2 x 2 ng/ml LPS

2 x 20 ng/ml LPS

2 x 200 ng/ml LPS

2 x 2000 ng/ml LPS

9. Inkubation über 1 Stunde bei 37 °C auf niedrigster Stufe geschüttelt
10. Vorbereitung der Resuspensionslösung
11. Resuspension mit 4°C kalter Lösung
12. 5 Minuten mit 2000 rpm abzentrifugieren
13. Messung von CD11b: siehe Abschnitt 4.2.4.

4.3.3 Experiment 3:

Messung der CD11b-Expression auf PNG nach Stimulation mit CD14-unabhängigen Stimulanzen

1. Blutabnahme und Antikoagulation
2. Aufteilung des Blutes in jeweils 100 µl Proben
3. Stimulation mit jeweils 5 µl der entsprechenden Lösung die folgenden Konzentrationen entsprach:
 - a) 100 ng/ml PMA
 - b) 100 nMol/ml FMLP (beides Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
 - c) 10 ng/ml TNF (rekombinates humanes TNFα von R&D-Systems; Wiesbaden)
 - d) 2 ng/ml LPS
 - e) 0,9 %-iges NaCl
4. Inkubation über 1 Stunde bei 37 °C
5. Vorbereitung der Resuspensionslösung
6. Resuspension mit kalter Lösung
7. Zentrifugation über 5 Minuten mit 2000 rpm
8. Messung von CD11b: siehe Abschnitt 4.2.4.